

# Nogo-A knockout mice

## a systems biology approach to understand regeneration

**Doctoral Thesis****Author(s):**

Montani, Laura

**Publication date:**

2008

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005746408>

**Rights / license:**

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

DISS. ETH No. 17915

**Nogo-A knockout Mice:  
a Systems Biology Approach to understand Regeneration**

A dissertation submitted to  
ETH Zurich

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

**LAURA MONTANI**

Diploma di Laurea in Scienze Biologiche, Università degli Studi dell'Insubria (Italy)

21<sup>st</sup> May, 1978

Citizen of Italy

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin E. Schwab, examiner

Prof. Dr. Ulrich Suter, co-examiner

Dr. Bernd Wollscheid, co-examiner

2008

## Abstract

Nogo-A, a member of the Reticulon family, is a membrane protein that is expressed during development in neurons and in adulthood mainly in myelin of the central nervous system (CNS) (Huber et al., 2002; Oertle et al., 2003b; Oertle and Schwab, 2003). Nogo-A is known to play an important role in inhibiting axonal regeneration and plasticity in the adult CNS. It has been shown that its acute neutralization through antibody application induces sprouting and regeneration after spinal cord or brain injury (Schwab, 2004).

To better understand the action of this molecule, Nogo knockout mice with mixed undefined genetic background have been generated in three different laboratories (Kim et al., 2003b; Simonen et al., 2003; Zheng et al., 2003). They yielded different results, from a clearly increased regeneration capacity to no clear regeneration after spinal cord injury (Woolf, 2003). To investigate whether the genetic backgrounds of the generated mice could influence their regenerative potential, Nogo-A KO mice have been backcrossed into the two pure strains C57Bl/6 and 129X1/SvJ. Both lines showed increased regeneration following spinal cord injury. However, the 129X1/SvJ Nogo-A KO mice regenerated two to four times more fibers. A transcriptomic analysis and further cell biological assays demonstrated an intrinsic difference in the growth/regenerative potential of the two strains.

The molecular mechanisms underlying the increased regenerative properties of the lesioned CNS of Nogo-A KO mice are not clear. Furthermore, the possible functions of Nogo-A in the intact adult CNS remain to be identified.

Inhibitory factors, e.g. Nogo-A, play a key role in restricting neurite outgrowth in the adult CNS. In order for the regenerative process to occur, Nogo-A neutralization following a lesion should induce a program of gene expression able and sufficient to support extension of axotomized axons. We present evidences of the selective regulation of two transcription factors, Sox11 and the zinc-finger protein 11s-6, in the lesioned spinal cord of adult Nogo-A KO mice. On the basis of our findings and previous literature, we suggest a potential role for Sox11 in orchestrating the shift in gene expression necessary for a successful regeneration to occur in the lesioned CNS in the absence of Nogo-A.

Regeneration observed in Nogo-A knockout mice is not extensive, probably due to the upregulation of yet unidentified compensatory inhibitory molecules. On the other hand, following Nogo-A neutralization in adult rats, sprouting of fibers has been reported even in

the absence of a lesion (Bareyre et al., 2002; Buffo et al., 2000; Gianola et al., 2003). Through a combined genomic/proteomic screening approach, we identified potential compensatory inhibitory molecules belonging to the Ephrin and Semaphorin families, as well as their receptor families, Eph and Plexin. We also show that the ablation of Nogo-A in the intact CNS causes the enhancement of the neuronal growth machinery on the molecular level, reflected in the regulation of several cytoskeleton and signaling proteins, which is translated on a morphological level into enhanced growth cone surface area and dynamics. We provide evidences for the involvement of the LIMK1/cofilin pathway. Finally, we suggest two additional potential functions for Nogo-A in the intact CNS, in ER stress response and in synapse function and neurotransmission.

## Sommario

Nogo-A, appartenente alla famiglia dei reticuloni, e' una proteina di membrana espressa durante lo sviluppo embrionale nei neuroni e nello stadio di vita adulta principalmente nella mielina del sistema nervoso centrale (Huber et al., 2002; Oertle et al., 2003b; Oertle and Schwab, 2003). Successivamente ad una lesione, Nogo-A svolge un ruolo fondamentale nell'inibire la rigenerazione assonale, nonché la plasticità, del sistema nervoso centrale adulto. E' stato dimostrato che la sua neutralizzazione per mezzo di anticorpi e' in grado di promuovere la rigenerazione e lo sprouting assonale dopo una lesione spinale o cerebrale (Schwab, 2004).

Per meglio comprendere i meccanismi d'azione di questa molecola, tre laboratori hanno generato indipendentemente topi Nogo knockout (KO) in background genetico misto (Kim et al., 2003b; Simonen et al., 2003; Zheng et al., 2003). Le conclusioni a cui i tre studi sono giunti si sono però dimostrate alquanto differenti: da un chiaro incremento nelle proprietà regenerative sino all'assenza di rigenerazione dopo lesione del midollo spinale (Woolf, 2003). Per investigare se il background genetico potesse influenzare il potenziale rigenerativo, i topi Nogo-A KO sono stati incrociati fino ad ottenere progenie in due background omogenei, C57Bl/6 e 129X1/SvJ. Entrambe le linee hanno mostrato un incremento nella rigenerazione assonale dopo lesione del midollo spinale, ma i topi Nogo-A KO 129X1/SvJ presentavano da due a quattro volte più fibre nervose regeneranti. Un'analisi trascrittomica e successivi esperimenti di biologia cellulare hanno permesso di dimostrare l'esistenza di una differenza intrinseca nel potenziale di crescita/rigenerativo, dovuta al diverso background genetico.

I meccanismi molecolari responsabili dell'incremento delle proprietà regenerative, osservato nel sistema nervoso centrale lesionato dei topi Nogo-A KO, non sono stati ancora chiariti. In aggiunta, le possibili funzioni di Nogo-A nel sistema nervoso centrale intatto restano da essere identificate.

Fattori inibitori, come Nogo-A, giocano un ruolo chiave nel ridurre la rigenerazione nervosa nel sistema nervoso centrale adulto. Affinché il processo rigenerativo possa aver luogo, la neutralizzazione di Nogo-A deve indurre un programma di espressione genica in grado, e sufficiente, a permettere la crescita degli assoni lesionati. Nel presente studio, riportiamo che in topi Nogo-A KO adulti e' possibile osservare la specifica regolazione di due fattori di trascrizione, Sox11 e zinc-finger 11s-6, in seguito a lesione spinale. Sulla base della corrente letteratura scientifica e dei risultati ottenuti, formuliamo

l'ipotesi che Sox11, in assenza di Nogo-A, orchestri lo shift nell'espressione genica, necessario affinché il processo rigenerativo del sistema nervoso centrale lesionato possa avvenire con successo.

Il grado di rigenerazione osservato in topi Nogo-A KO dopo una lesione del sistema nervoso centrale non è esteso, probabilmente in seguito alla iper-regolazione di altre molecole inibitrici non ancora identificate, compensanti per la mancata espressione di Nogo-A. D'altro canto, è stato però riportato che la neutralizzazione di Nogo-A in ratti adulti può indurre sprouting delle fibre nervose anche in assenza di una lesione (Bareyre et al., 2002; Buffo et al., 2000; Gianola et al., 2003). Attraverso un approccio combinato di screening genomico/proteomico, abbiamo identificato nuove potenziali molecole inibitrici, appartenenti alle famiglie delle Efrine e Semaforine, nonché alle famiglie dei loro recettori, Eph e Plexine. Mostriamo, inoltre, come la soppressione dell'espressione di Nogo-A nel sistema nervoso centrale adulto moduli la crescita neuritica, anche in assenza di una lesione. Tale modulazione si riflette nella regolazione di numerose proteine del citoscheletro e proteine di signaling, e viene tradotta a livello morfologico in un incremento nella superficie e nella dinamica dei coni di crescita. Forniamo evidenze del coinvolgimento della LIMK1 e della cofilina nella regolazione di questo processo. In ultimo, suggeriamo due ulteriori funzioni per Nogo-A nel sistema nervoso centrale adulto: nella risposta allo stress cellulare da parte del reticolo endoplasmatico e nella trasmissione sinaptica.